

© Коллектив авторов, 2008

А. Я. Гончарова¹, А. С. Камруков², А. Б. Кирпиченков³, Н. П. Козлов²,
Н. Н. Кутина¹, Р. А. Розиев¹, В. А. Сарычев⁴, А. Ф. Селиверстов⁵

ФОТООКИСЛИТЕЛЬНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВЫСОКОИНТЕНСИВНОГО ИМПУЛЬСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СПЛОШНОГО СПЕКТРА

¹ ООО "Медбиофарм", Обнинск Московской области, Россия;

² НИИЭМ МГТУ им. Н. Э. Баумана, Москва, Россия;

³ ЗАО "Эликс", Оболенск Московской области, Россия;

⁴ ООО "Геленпол", Обнинск Московской области, Россия;

⁵ ИФХ РАН, Москва, Россия

Предложен и экспериментально исследован новый окислительный процесс деструкции органических соединений белковой природы в водных растворах, основанный на комбинированном применении высокоинтенсивного импульсного излучения сплошного спектра и перекиси водорода. В качестве источника излучения использована мощная импульсная ксеноновая лампа. На примере водного раствора гемоглобина показана возможность эффективной фотоокислительной деструкции белка, сопровождающейся значительным снижением химического потребления кислорода и сухого остатка. Исследованный процесс может быть использован при разработке новых технологий очистки сточных вод современных промышленных производств лекарственных и биохимических препаратов.

Сточные воды современных промышленных производств лекарственных и биохимических препаратов характеризуются значительными концентрациями (порядка нескольких граммов на 1 л и более) высокомолекулярных органических соединений естественного и искусственного происхождения (белки, аминокислоты, антибиотики и т. п.). Кроме того, такие стоки, так же как жидкие отходы медицинских учреждений, могут быть массивно загрязнены различными видами патогенной микрофлоры. Это практически полностью исключает их прямой сброс в системы централизованной канализации и делает проблему эффективной очистки и обезвреживания таких сточных вод чрезвычайно актуальной.

В настоящей работе экспериментально исследуется возможность решения этой задачи с помощью жидкофазного фотоокислительного процесса разрушения органических веществ, осуществляемого под действием высокоинтенсивного импульсного оптического излучения сплошного спектра. Такое излучение генерируется мощными плазменными лампами на основе сильноточного импульсного электрического разряда в ксеноне (импульсные ксеноновые лампы) и характеризуется высокой плотностью потока фотонов и непрерывным эмиссионным спектром в спектральной области 190...1400 нм [1, 2]. При этом доля УФ-излучения, обладающего максимальной фотохимической и фотобиологической активностью, в суммарном спектре импульсных ксеноновых ламп может достигать 30–40%. Поэтому одновременно с фотохимической очисткой сточных вод, содержащих органические соединения белкового происхождения, будет происходить эффективный процесс их обеззараживания от микрофлоры, требующий, как правило, значительно меньших удельных затрат энергии [3].

В описываемых экспериментах объектом исследований являлись водные растворы гемоглобина. Такой выбор обусловлен как широким распространением этого вида белка (он содержится в эритроцитах крови почти всех позвоночных и гемолимфе большинства беспозвоночных животных), так и его достаточно высокой репрезентативностью: детальное изучение фотоокислительной деструкции гемоглобина позволяет выявить ряд принципиальных аспектов процесса, общих для многих других белков.

Гемоглобин взрослого человека имеет молекулярный вес $\approx 6,5 \cdot 10^4$ и принадлежит к числу наиболее изученных белков [4]. Его молекула содержит 4 гема и 1 глобин. Гем представляет собой ферросоединение протопорфирина с молекулярным составом $C_{34}H_{32}O_4N_4Fe$, придающий соединению характерную красную окраску. Белковый компонент гемоглобина — глобин — содержит 4 парно идентичных полипептидных цепочек, включающих в общей сложности 574 аминокислоты. Гемоглобин — основной белок дыхательного цикла, участвующий в переносе O_2 от органов дыхания к тканям, а в обратном направлении — CO_2 .

Опыты проводили с раствором гемоглобина в дистиллированной воде, который готовился растворением гемоглобина, содержащего $\approx 60\%$ гемоглобина. Концентрация гемоглобина в растворе определялась спектрофотометрически гемиглобинцианидным методом и составляла 5,1 г/л. Визуально раствор имел насыщенный темно-красный цвет. Оптические характеристики растворов исследовались на спектрофотометре Helios-γ.

На рис. 1, а (кривая 1) приведен спектр пропускания 1 см слоя исходного раствора при его 21-кратном разбавлении дистиллированной водой, а на рис. 1, б (кривая 1)

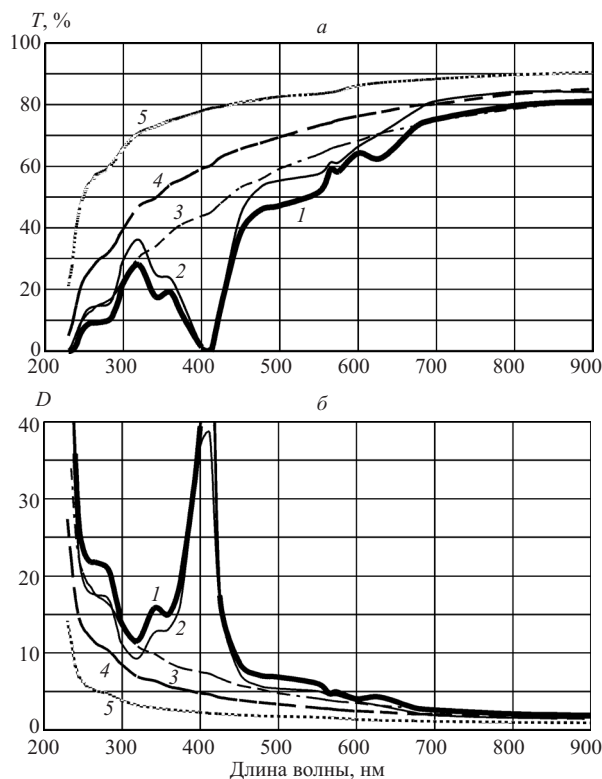


Рис. 1. Спектры пропускания при 21-кратном разведении (*a*) и оптической плотности (*б*) гемоглобинсодержащих растворов до и после физико-химической обработки. 1 — исходный раствор; 2 — после 30 мин обработки перекисью водорода; 3 — после 3 мин УФ/Н₂О₂-обработки; 4 — после 6 мин УФ/Н₂О₂-обработки; 5 — после 9 мин УФ/Н₂О₂-обработки.

— спектральная зависимость оптической плотности неразведенного раствора толщиной 1 см, рассчитанная в предположении отсутствия заметной концентрационной зависимости коэффициента экстинкции молекул гемоглобина. На полученных спектрах отчетливо наблюдаются характерные полосы поглощения молекулы гемоглобина: сильная полоса поглощения в коротковолновой УФ-области ($\lambda < 230$ нм), обусловленная поглощением излучения пептидными связями, УФ-полоса в диапазоне $\lambda \approx 260 \dots 280$ нм, связанная с поглощением аминокислотами, и в видимой области — хромофорная полоса гема с центром на $\lambda \approx 412$ нм (интенсивное поглощение, определяющее окраску раствора).

Физико-химический анализ растворов до и после обработки включал измерение химического потребления кислорода (ХПК) методом ускоренной бихроматной окисляемости, водородного показателя pH и содержания сухого остатка. Согласно проведенным измерениям, исходный раствор имел следующие физико-химические показатели: ХПК = 400 мгО₂/л, pH = 6,6 и сухой остаток — 7,8 г/л.

Сначала было исследовано окисление исходного раствора гемоглобина перекисью водорода с дозой 3 г/л в “темновых” условиях. Продолжительность эксперимента составила 30 мин при перемешивании раствора. В процессе эксперимента зарегистрировано образование пены в объеме $\approx 10\%$ от объема раствора. После отстаивания в течение 1 ч образование нерастворимого осадка и заметных визуальных изменений цвета раствора не наблюдалось. Измерение ХПК, pH и сухого остатка также не вы-

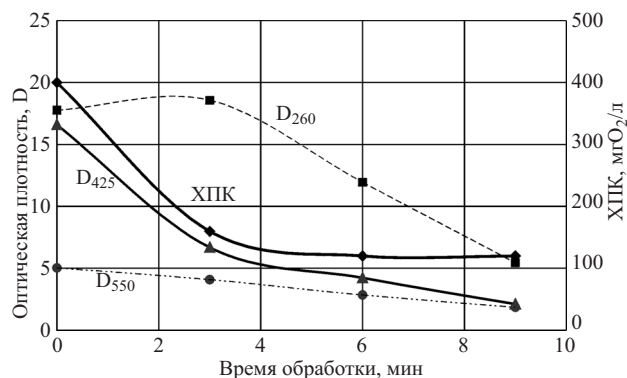


Рис. 2. Зависимость оптической плотности раствора на различных длинах волн и ХПК от времени УФ/Н₂О₂-обработки.

явило каких-либо значительных изменений характеристик раствора. Спектр пропускания обработанного раствора (рис. 1, *a*, кривая 2) качественно не изменился, однако некоторые количественные модификации его оптических характеристик произошли — увеличилась прозрачность раствора в УФ-области спектра и в видимом диапазоне, что может указывать на протекание (однако сравнительно медленное) окислительных процессов.

Известно [5], что совместное применение перекиси водорода и УФ-излучения позволяет существенно ускорить процесс окислительной деструкции органических соединений. Механизм ускорения связывают с фотодиссоциацией Н₂О₂ и образованием гидроксильных радикалов НО^{*}, обладающих высокой окислительной способностью. При этом в подавляющем большинстве проведенных экспериментов [5] в качестве УФ источников использовались традиционные ртутные лампы, которые характеризуются низкой интенсивностью излучения (менее 1 Вт с 1 см² поверхности лампы) и практически монохроматичным эмиссионным спектром (одна узкая линия на длине волны $\lambda = 254$ нм). Применение в таких процессах широкополосных источников УФ-излучения с высокой спектральной интенсивностью может привести к существенному изменению механизма протекающих окислительных реакций, связанному как с высокой мгновенной концентрацией образующихся под действием такого излучения гидроксильных радикалов, так и с возможными одновременными процессами электронного возбуждения и фотодиссоциации самих органических молекул. Однако данные вопросы на сегодняшний день практически не изучены.

Были проведены эксперименты по облучению водного раствора гемоглобина мощной импульсной ксеноновой лампой в присутствии в исходном растворе перекиси водорода. Комбинированный окислительный процесс осуществляли в циркуляционном режиме на экспериментальной установке, аналогичной описанной в [1]. Гидравлический контур установки включал приемную емкость объемом 5 л, центробежный насос, обеспечивающий циркуляцию раствора по контуру с расходом ≈ 200 л/ч, и кварцевый фотохимический реактор с аксиально-расположенной импульсной лампой. В реакторе использовалась серийная ксеноновая лампа типа ИНП-7/80 (первая цифра соответствует внутреннему диаметру лампы, вторая — длине межэлектродного расстояния в мм). Лампа работала с частотой 3 Гц при средней электрической

мощности 210 Вт. Согласно проведенным спектрально-энергетическим измерениям, пиковая мощность интегрального по спектру излучения составляла ≈ 600 кВт, плотность потока УФ-излучения ($\Delta\lambda = 200 \dots 400$ нм) с поверхности лампы достигала 12 кВт/см² при длительности импульса на полувысоте ≈ 70 мкс.

Методика проведения экспериментов заключалась в следующем. В приемную емкость заливали исследуемый раствор гемоглобина объемом 1,5 л и включали циркуляционный насос. Затем в раствор добавляли перекись водорода с концентрацией $\approx 5,5$ г H₂O₂/л (соотношение гемоглобина к перекиси $\approx 1:1,1$) и включали импульсную лампу фотохимического реактора. Пробы для физико-химических и спектральных анализов отбирали через каждые 3 мин. В течение всего эксперимента осуществляли непрерывный контроль температуры обрабатываемого раствора. За 3 мин обработки температура раствора увеличивалась в среднем на ≈ 7 °С и к концу цикла экспериментов составляла 41 °С, что недостаточно для тепловой деструкции гемоглобина. В процессе обработки визуально было отмечено существенное изменение окраски раствора (с темно-красного в начале обработки до светло-коричневого в конце), появление взвеси в растворе, образование осадка и обильное пенообразование.

Нерастворимую фракцию отделяли на фильтре, высушивали в термостате при 60 °С, и определяли ее выход. Содержание нерастворимых веществ составило 5 г/л. Это свидетельствует о том, что ≈ 65 % исходных органических веществ выделилось в твердую фазу. Выход органических веществ с пеной составил 1 г/л. Таким образом, в результате фотоокислительной обработки содержание органических веществ в растворе снизилось в 4,3 раза (сухой остаток — 1,8 г/л).

На рис. 1, а (кривые 3 – 5) представлены спектры пропускания обработанных растворов различной экспозиции. Спектральные зависимости оптической плотности гемоглобинсодержащих растворов до и после физико-химической обработки приведены на рис. 1, б. Как можно видеть из представленных данных, комбинированная УФ/H₂O₂-обработка приводит к качественной модификации спектральных характеристик раствора — исчезает хромофорная полоса гема, спектр пропускания становится бесструктурным, что отражается также и в изменении окраски раствора. С увеличением УФ-экспозиции наблюдается рост прозрачности раствора практически на всех длинах волн. Исчезновение хромофорной полосы гема

уже после 3 мин обработки свидетельствует о глубоких внутренних изменениях физико-химической структуры молекулы гемоглобина и фактически о полной биологической инактивации белка.

Зависимости оптической плотности раствора в УФ-области ($\lambda = 260$ нм) и на различных длинах волн в видимой области ($\lambda = 425$ нм и $\lambda = 550$ нм) от времени УФ/H₂O₂-обработки представлены на рис. 2. Там же приведены результаты измерений химического потребления кислорода. После 3 мин обработки раствора ХПК снижался с 400 до 160 мгO₂/л, т. е. практически до нормативного уровня разрешенного сброса стоков в систему централизованной канализации по показателю ХПК (предельное значение — 150...160 мгO₂/л). Удельные затраты электроэнергии при этом составили ≈ 25 Дж/см³ или ≈ 7 Вт · ч/л. При дальнейшей обработке скорость снижения ХПК уменьшалась, и после 6 мин этот показатель стабилизировался на уровне ≈ 120 мгO₂/л, несмотря на монотонное снижение оптической плотности раствора на всех длинах волн.

Таким образом, проведенные эксперименты показали принципиальную возможность применения нового импульсного фотоокислительного процесса для очистки сточных вод, сильно загрязненных растворенными органическими соединениями белковой природы. Дальнейшие исследования в этом направлении могут привести к созданию новой эффективной технологии очистки и обезвреживания сточных вод предприятий химико-фармацевтической промышленности.

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства по образованию РФ (проект № 2.1.1.1727) и Программы поддержки ведущих научных школ РФ (грант № НШ-5188.2006.8).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. С. Камруков, Н. П. Козлов, А. Ф. Селиверстов и др., *Безопасность в техносфере*, № 1, 38 – 44 (2006).
2. И. С. Маршак, *Импульсные источники света*, Энергия, Москва (1978).
3. В. П. Архипов, А. С. Камруков, Н. П. Козлов, и др., *Конверсия*, № 6, 46 – 50 (1996).
4. Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес и др., *Биохимия человека*, Мир, Москва (1993).
5. O. Legrini, E. Oliveros, and A. M. Braun, *Chem. Rev.*, **93**, 671 – 698 (1993).

Поступила 02.11.06

PHOTOOXIDATIVE DESTRUCTION OF HEMOGLOBIN IN AQUEOUS SOLUTIONS UNDER THE ACTION OF HIGH-INTENSITY PULSED CONTINUOUS-SPECTRUM RADIATION

A. Ya. Goncharova¹, A. S. Kamrukov², A. B. Kirpichenkov³, N. P. Kozlov², N. N. Kutina¹, R. A. Roziev¹, V. A. Sarychev⁴, and A. F. Seliverstov⁵

¹ Medbiofarm Company, Obninsk, Kaluga oblast, Russia;

² Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia;

³ Elik Company, Obninsk, Kaluga oblast, Russia;

⁴ Gelenpol Company, Obninsk, Kaluga oblast, Russia;

⁵ Institute of Physical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

We have developed and tested a new process for the oxidative destruction of organic substances of the protein nature in aqueous solutions, which is based on the combined action of hydrogen peroxide and high-intensity pulsed radiation with a continuous spectrum. A high-power pulsed xenon lamp is used as a source of radiation. The effective photooxidative destruction of hemoglobin in aqueous solutions, which leads to a significant decrease in the consumption of oxygen and in the amount of dry residue is demonstrated. The proposed process can be used for the development of new waste water processing technologies for the modern industry of medicinal and biochemical preparations.